

**XIX SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS
X SIMPÓSIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSAS**30 de julho-02 de agosto de 2013
Foz de Iguaçu, PR, Brasil**HIDRÓLISE ENZIMÁTICA, SACARIFICAÇÃO E FERMENTAÇÃO
SIMULTÂNEA DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS USANDO
SACCHAROMYCES CEREVISIAE CA11**F. A. GONÇALVES^{1,2}, H. A. RUIZ^{2,3}, E. S. DOS SANTOS¹, J. A. TEIXEIRA², G. R. MACEDO¹¹Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Departamento de Engenharia Química²Universidade do Minho, Departamento de Engenharia Biológica³Universidade Autônoma de Coahuila, Departamento de Pesquisa Alimentar

E-mail: fabiano_avelinogoncalves@yahoo.com.br

RESUMO – A necessidade de aumentar a oferta de energia líquida e limpa na matriz energética mundial possibilita a produção de etanol como uma solução emergente e eficaz. Neste contexto, o objetivo desse trabalho consiste em analisar a hidrólise enzimática dos materiais lignocelulósicos pré-tratados (10 % p/v) e a fermentação e sacarificação simultânea (SSF) pela levedura flocculante e termotolerante *Saccharomyces cerevisiae* CA11. As hidrólises enzimáticas apresentaram conversões dos materiais lignocelulósicos em glicose entre 75 a 85 %. A SSF realizada pela *S. cerevisiae* CA11 sob a fibra de coco maduro pré-tratada hidrotermicamente catalisada com hidróxido de sódio resultou em produção e rendimento de etanol de 25.83 g/L e 0.46 g/g, respectivamente. Dessa forma, os resultados obtidos sinalizam a possibilidade benéfica de utilizar esses materiais lignocelulósicos pré-tratados e a *S. cerevisiae* CA11 na produção de etanol celulósico.

1. INTRODUÇÃO

A utilização de biocombustíveis surge como alternativa de mitigar a pressão exercida pelos combustíveis fósseis e seus derivados, com destaque do etanol. Entretanto, o etanol produzido a partir do amido de milho, sacarose da cana-de-açúcar e beterraba, podem futuramente ocorrer numa conjuntura que configure competição entre a utilização desses materiais para produção de bioenergia ou alimentação (Gonçalves et al., 2011). Uma opção consiste na produção de etanol celulósico a partir do aproveitamento de vegetais cultivados em locais inóspitos, resíduos agroindustriais e urbanos de origem vegetal, que permitirá elevada abrangência geográfica, aumento significativo na oferta de energia limpa e aumento na produção de etanol sem a necessidade de expansão no uso de terras agricultáveis (Gonçalves et al., 2011).

A utilização de levedura flocculante torna-se uma alternativa promissora para a produção de etanol celulósico. Sendo a flocculação um processo reversível, assexual e de agregação de células de leveduras em massas multicelulares com rápida sedimentação (Zhao e Bai, 2009). Promove assim, a redução de custos de tratamento *downstream*, resistência à contaminação microbiana, menor sensibilidade ao estresse provocado pela concentração de etanol e compostos inibitórios (Verstrepen et al., 2003; Zhao e Bai, 2009). Além de possibilitar o reciclo celular em hidrolisado que possui material lignocelulósico pré-tratado com baixo teor de lignina. Dessa forma, este trabalho objetiva avaliar a hidrólise enzimática e produção de etanol pela levedura flocculante e termotolerante *S. cerevisiae* CA11 em materiais lignocelulósicos pré-tratados.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Materiais

Os materiais lignocelulósicos utilizados foram o cacto, casca de coco verde, fibra de coco maduro e a casca de coco maduro pré-tratados por peróxido de hidrogênio seguido de hidróxido de sódio, autohidrólise, hidrotérmico catalisado com hidróxido de sódio e *organosolv*. Os melhores materiais lignocelulósicos de acordo com cada pré-tratamento são apresentados na Tabela 1 e foram utilizados na hidrólise enzimática e SSF.

Tabela 1. Composição dos materiais lignocelulósicos

Pré-tratamento	Material lignocelulósico	Glicose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina Klason (%)	Cinzas (%)
<i>In natura</i> ^a	Fibra de coco maduro	32.18	27.81	25.02	3.31
	Casca de coco maduro	29.58	27.76	31.04	4.84
	Casca de coco verde	33.23	29.14	25.44	4.34
Autohidrólise ^b	Cactos	38.12	23.50	19.51	6.64
	Casca de coco verde	41.97	8.08	41.29	1.22
Hidrotérmico catalisado com hidróxido de sódio ^c	Fibra de coco maduro	56.44	12.59	13.52	8.30
<i>Organosolv</i> ^d	Cactos	72.67	7.71	4.60	9.20
Peróxido de hidrogênio seguido de hidróxido de sódio ^a	Fibra de coco maduro	51.80	25.81	8.83	2.98

2.2. Hidrólise enzimática

A etapa de hidrólise enzimática foi realizada utilizando o kit enzimático Cellic CTec 2 e HTec 2 (Novozymes, Denmark). A carga enzimática utilizada foi de: 30 FPU; 75 CBU e 130 xilanases por grama de material lignocelulósico (Mandels et al., 1976; Miller, 1959; Leite et al., 2007).

A hidrólise enzimática foi realizada com 10 % (p/v) de material lignocelulósico pré-tratado e 48 mL de tampão de citrato de sódio a 50 µM (pH 5.0) em frascos Erlenmeyer de 250 mL, acondicionado a 50 °C, agitação de 150 rpm, durante 96 h (Dowe e McMillan, 2001; Gouveia et al., 2010). Todas as determinações foram realizadas em duplicata.

2.3. Micro-organismos

A *S. cerevisiae* CA11 foi obtida da coleção microbiana do Laboratório de Fisiologia de Micro-organismo da Universidade Federal de Lavras. A linhagem foi mantida em placas com ágar formulada por extrato de levedura (10 g/L), peptona (20 g/L), ágar (20 g/L) e glicose (20 g/L), a 4 °C.

Preparo do inóculo: O inóculo foi cultivado em frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 100 mL de meio de cultivo contendo glicose (50 g/L), peptona (10 g/L), extrato de levedura (10 g/L), sulfato de amônia (1 g/L), fosfato de potássio (0.5 g/L) e sulfato de magnésio (0.25 g/L) (Gouveia et al., 2010) e o cultivo realizado em pH 5.0, acondicionado a 200 rpm e 42 °C, durante 12 h.

2.4. Processo de fermentação e sacarificação simultânea (SSF)

A SSF foi realizada com 10 % (p/v) de material lignocelulósico pré-tratado e 48 mL de tampão de citrato de sódio a 50 mM (pH 5.0) em frascos Erlenmeyer de 250 mL, suplementado com sulfato de amônia (1 g/L), fosfato de potássio (0.5 g/L), sulfato de magnésio (0.25 g/L), extrato de levedura (2 g/L) e peptona (1 g/L) (Dowe e McMillan, 2001; Gouveia et al., 2010). A biomassa microbiana inoculada foi equivalente a densidade óptica de 2.0 em λ de 600 nm, acondicionado a 200 rpm, a 42 °C, durante 60 h. Todas as determinações foram realizadas em duplicata.

2.5. Métodos analíticos

As amostras foram centrifugadas e filtradas para quantificação dos carboidratos e etanol. A separação cromatográfica foi realizada utilizando a coluna Metacarb 87 H (300x7.8 mm, Varian,

USA) sob a seguinte condições: fase móvel 5 μM H_2SO_4 , fluxo de 0.7 mL/min e temperatura da coluna de 60 °C. O CLAE usado foi da Jasco (Jasco, Japan).

As conversões de glicose e etanol foram realizadas de acordo com Dowe e McMillan (2001).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A maior conversão de glicose ocorreu em fibra de coco maduro pré-tratada pelo processo hidrotérmico catalisado com hidróxido de sódio (84.49 %), seguido pela fibra de coco maduro pré-tratada por peróxido de hidrogênio seguido de hidróxido de sódio (82.31 %), cactos pré-tratado por *organosolv* (80.61 %) e casca de coco verde pré-tratada por autohidrólise (75.66 %) (Figura 1 e 2).

A SSF foi realizada pela *S. cerevisiae* sob a fibra de coco maduro pré-tratada pelo processo hidrotérmico catalisado com hidróxido de sódio, a qual apresentou maior conversão em glicose durante a hidrólise enzimática, resultou em produção e rendimento de etanol de 25.83 g/L e 0.46 g/g (Figura 3 e Tabela 2). Esses resultados são similares aos citados na literatura, dessa forma, essa linhagem possui elevado potencial fermentativo em elevada temperatura, sem perder a capacidade floculante. Ruiz et al. (2012), cultivaram essa linhagem a 45 °C sob palha de trigo pré-tratada e resultou em produção de etanol de 14.85 g/L (82.4 % de etanol teórico).

A temperatura é um fator crucial para o processo SSF, sendo necessária a combinação entre as temperaturas ótimas da hidrólise enzimática e do processo fermentativo (Ruiz et al., 2012), além da temperatura afetar diretamente a ecologia microbiana e as reações bioquímicas da levedura (Torija et al., 2003). Neste contexto, os resultados obtidos pela *S. cerevisiae* demonstram a vantagem de utilizá-la em processos fermentativos, principalmente por ser uma levedura floculante e termotolerante.

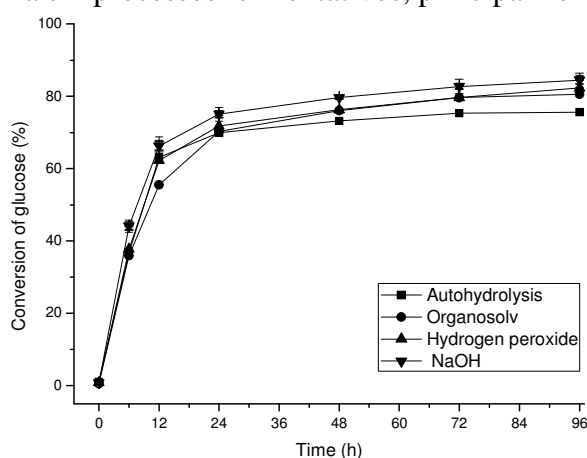


Figura 1. Hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos pré-tratados.

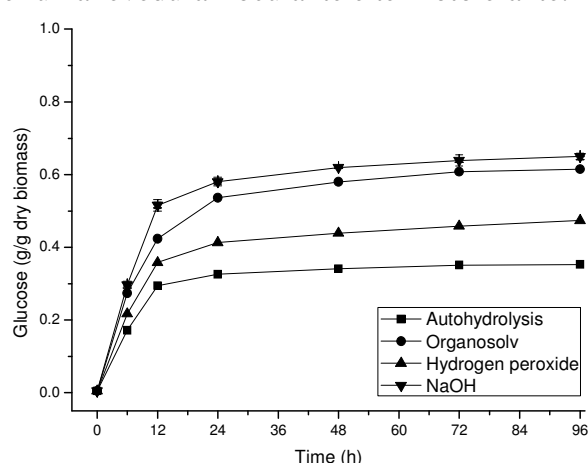


Figura 2. Hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos pré-tratados.

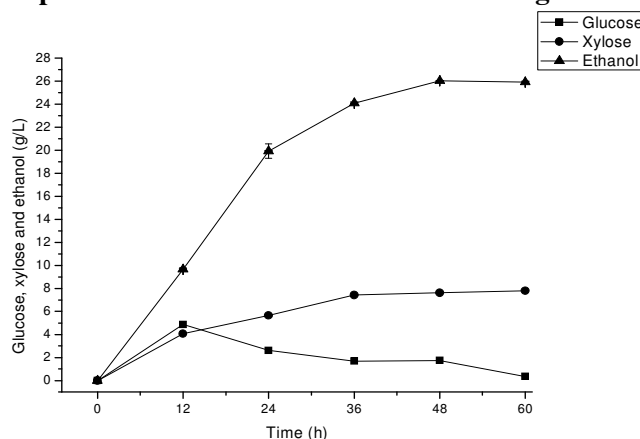


Figura 3. Perfil cinético da fermentação de *S. cerevisiae* CA11 sob a fibra de coco maduro pré-tratada hidrotérmicamente catalisada por hidróxido de sódio usando SSF.

Tabela 1. Parâmetros cinéticos da fermentação de *S. cerevisiae* CA11 sob a fibra de coco maduro pré-tratada hidrotêrmicamente catalisada por hidróxido de sódio usando SSF

Pré-tratamento	Y _{x/s}	Etanol		
		Rendimento (%)	Produção (g/L)	Produtividade (g/L/h)
Hidrotêrmico catalisado com hidróxido de sódio	0.46	89.79	25.83	0.43

4. CONCLUSÃO

Os pré-tratamentos realizados nos materiais lignocelulósicos possibilitaram significativas conversões desses materiais em glicose durante a hidrólise enzimática.

A possibilidade de utilizar inúmeras matérias-primas para a produção de etanol por SSF demanda busca por micro-organismos termotolerantes, que, além da possibilidade de flocularem no término do processo fermentativo apresentam resiliência aos compostos inibitórios, tanto oriundos do material lignocelulósico, quanto do etanol produzido. E, em princípio, a *S. cerevisiae* CA11 apresenta essas características.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o financiamento da pesquisa pelas agências de fomento CNPq, CAPES e FUNDECT.

6. REFERÊNCIAS

- DOWE, N.; MCMILLAN, J. SSF experimental protocols-lignocellulosic biomass hydrolysis and fermentation. NERL analytical procedure. *National Renewable Energy Laboratory*: Golden, CO, p. 1-19, 2001.
- GONÇALVES, F.A.; SANJINEZ-ARGANDOÑA, E.J.; FONSECA, G.G. Utilization of agro-industrial residues and municipal waste of plant origin for cellulosic ethanol production. *J. Environ. Protect*, v. 2, p. 1303-1309, 2011.
- GOUVEIA, E.R.; SANTOS, J.R.A.; SOUTO-MAIOR, A.M.; MARTIN, C. Comparação entre processos em SHF e em SSF de bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae*. *Química Nova*, v.33, p. 904-908, 2010.
- LEITE, R.S.R.; BOCCHINI, D.A.; MARTINS, E.S.; SILVA, D.; GOMES, E.; DA SILVA, R. Production of cellulolytic and hemicellulolytic enzymes from *Aureobasidium pulluans* on solid state fermentation. *Appl. Microbiol. Biotech.*, v. 137-140, p. 1-12, 2007.
- MANDELS, M.; REESE, E.T. Induction of cellulase in fungi by cellobiose. *J. Bacteriology*, v. 73, p. 816-826, 1957.
- MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal. Chem.* v. 31, p. 426-428, 1959.
- RUIZ, H.A.; SILVA, D.P.; RUZENE, D.S.; LIMA, L.F.; VICENTE, A.A.; TEIXEIRA, J. A. Bioethanol production from hydrothermal pretreated wheat straw by a flocculating *Saccharomyces cerevisiae* strain – Effect of process conditions. *Fuel*, v. 95, p. 528-536, 2012.
- TORIIA, M.J.; ROZÈS, N.; POBLET, M.; GUILLAMÓN, J.M.; MAS, A. Effects of fermentation temperature on the strain population of *Saccharomyces cerevisiae*. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 80, p. 47-53, 2003.
- VERSTREPEN, K.J.; DERDELINCKX, G.; VERACHTERT, H.; DELVAUX, F.R. Yeast flocculation: What brewers should know. *Appl. Microbiol. Biotech.*, v. 61, p. 197-205, 2003.
- ZHAO, X.Q.; BAI, F.W. Yeast flocculation: new story in fuel ethanol production. *Biotechnol. Adv.*, v. 27, p. 849-856, 2009.